

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

23.03.00

RECD 19 MAY 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1999年 3月23日

出願番号
Application Number: 平成11年特許願第077350号

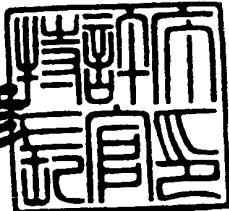
出願人
Applicant(s): 株式会社中外分子医学研究所

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3030281

【書類名】 特許願
【整理番号】 C2-101
【提出日】 平成11年 3月23日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社中外分子医学研究所内
【氏名】 曽和 義広
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社中外分子医学研究所内
【氏名】 織田 哲郎
【特許出願人】
【識別番号】 596102791
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【弁理士】
【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 041092
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1

特平11-077350

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗腫瘍剤のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗腫瘍剤をスクリーニングする方法であつて、

(a) (i) Sp3タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質のDNA結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードするDNAを発現可能に含む第一のベクター、並びに (ii) 該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクター、を保持する細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に対し、被検試料を接触させ、該レポーター活性を測定する工程、

(c) 被検試料を該細胞に接触させない場合(対照)と比較して、該レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項2】 異種タンパク質がGAL4タンパク質、LexAタンパク質、またはテトラサイクリンリプレッサータンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ヒト成長ホルモン、または分泌型アルカリホスファターゼをコードする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 Sp3を介する転写活性を促進する化合物を有効成分とする抗腫瘍剤。

【請求項5】 請求項1から3のいずれかに記載のスクリーニングにより単離しうる、請求項4に記載の抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗腫瘍剤をスクリーニングする方法に関する。より詳しくは、腫瘍抑制のメカニズムに関連するSp3タンパク質を標的とした抗腫瘍剤のスクリーニ

ング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌とは、細胞周期、分化および形態を制御する正常な機構を破壊する一連の遺伝子変化の結果生じるものである。様々な癌細胞や形質転換細胞において、脱制御された細胞周期を停止させたり、分化を誘導したり、あるいは異常形態を正常形態に戻しうる能力に基づいて、数多くの天然化合物が単離されている。トリコスタチンA (Trichostatin A; 以下TSAと略す)(Sugita K et al. (1992). Cancer Res., 52, 168-172)および trapoxin (Itazaki H et al. (1990). J. Antibiot., 43, 1524-1532)もまた、脱形質転換能を有する物質として単離された。しかもこれらの物質は、分化および細胞周期の停止も誘導する。しかしながらこれらの物質がいかにしてそのような抗腫瘍活性示すかは不明であった。

【0003】

近年、ヒストン脱アセチル化酵素(以下HDACと略)が、これら薬剤の標的であると考えられている。実際、TSAおよびtrapoxin は、抗腫瘍活性効果が認められたのと同様の濃度において、HDAC活性を阻害する(Yoshida et al., 1990, J. Biol. Chem., 265:17174-17179; Kijima M et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 22429-22435)。急速に累積されてゆく知見は、ヒストンおよび非ヒストンタンパク質のアセチル化および脱アセチル化が、真核細胞の転写制御において重要な役割を果たしていることを示唆している(Wolffe AP and Pruss D. (1996). Cell, 84, 817-819、Wade PA et al. (1997). TIBS, 22, 128-132; Pazin MJ and Kadona ga JT. (1997). Cell, 89, 325-328; Struhl K. (1998). Genes Dev., 12, 599-606; Kuo MH and Allis CD. (1998). Bioessays, 20, 615-626)。多くの転写因子、転写活性補因子および基本転写開始複合体タンパク質がヒストンアセチル化酵素活性を有していることから、ヒストンのアセチル化が転写開始および促進に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また、近年の幾つかのHDACのクローニングや転写抑制因子、転写抑制補因子がHDACと複合体を形成することから(Wolffe AP. (1997). Nature, 387, 16-17)、HDACが転写抑制においては重要な役割を果たしていることが徐々に明らかとなってきた。HDAC阻害剤が抗腫

癌活性を示すことから、HDACは、その遺伝子産物が細胞増殖の停止や分化を誘導する抗腫瘍遺伝子群の転写を抑制していると考えられるのかも知れない(DePinho RA. (1998). *Nature*, 391, 533-536)。

【0004】

以前に本発明者らは、分化誘導剤としてよく知られており、 mM濃度でHDAC阻害剤としても作用する酪酸ナトリウム (sodium butyrate) が、 p53非依存形式でサイクリン-CDK阻害因子(負の細胞周期調節因子)であるp21/WAF1/Cip1の発現を誘導することを証明した(Nakano K et al. (1997). *J. Biol. Chem.*, 272, 22199-22206)。さらに本発明者らは、 sodium butyrateとTSAの両方がSp1結合配列を介して、 p21/WAF1/Cip1遺伝子プロモーターを活性化させることも報告した (Sowa Y et al. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 241, 142-150)。興味深いことに、 p21/WAF1/Cip1プロモーターのSp1結合部位はTGF- β 、 phorbol ester、 okadaic acid、 progesteroneあるいはgeranylgeranyl-transferase I阻害剤GGTI-298によるp21/WAF1/Cip1誘導の際にも関与することが近年報告されている(Datto MB et al. (1995). *J. Biol. Chem.*, 270, 28623-28628; Biggs JR et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 901-906; Adnane J et al. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6962-6970; Owen GI et al. (1998). *J. Biol. Chem.*, 273, 10696-10701)。これらのうち、 TGF- β やGGTI-298はSp1の転写活性を増強することにより、また、 progesteroneについてもSp1およびCBP/p300を介してp21/WAF1/Cip1の転写を誘導することが報告されている(Li JM et al. (1998). *Nucleic Acids Res.*, 26, 2449-2456; Owen GI et al. (1998). *J. Biol. Chem.*, 273, 10696-10701)。

【0005】

これらの報告は、 Sp1を介したヒストンアセチル化酵素の活性化による転写誘導を示唆するものと考えられる。ヒストンアセチル化は数多くの遺伝子の転写活性化に関与すると考えられてきている。逆にヒストン脱アセチル化は転写抑制に関与すると考えられているが、 詳細な機構は明らかでない。近年、 転写抑制因子であるN-CoRおよびSMRTが核内転写因子に結合することによりDNA配列特異的に転写を抑制することが報告されている(Horlein AJ et al. (1995). *Nature*, 377, 397-404; Kurokawa R et al. (1995). *Nature*, 377, 451-454.; Chen JD and Ev

ans RM. (1995). *Nature*, 377, 454-457)。また、これらの因子は同時にHDACと結合して高次複合体を形成することから、ヒストン脱アセチル化を介してクロマチンの構造を強固にすることにより転写が抑制されることが示唆されている (Pazin MJ and Kadonaga JT. (1997). *Cell*, 89, 325-328; Heinzel T et al. (1997). *Nature*, 387, 43-48; Allard L et al. (1997) *Nature*, 387, 49-55)。実際には、*promyelocytic leukemia*あるいは*promyelocytic leukemia zinc-finger*タンパク質とレチノイン酸受容体の融合タンパク質を用いた検討からは、HDACの結合が転写抑制に必要であることが示されている (Lin RJ et al. (1998). *Nature*, 391, 811-814; Grignani F et al. (1998). *Nature*, 391, 815-818; He LZ et al. (1998). *Nature Genet.*, 18, 126-135)。同様のHDACを介したDNA配列特異的な転写抑制機構はMyc/Mad/Max (Hassig C et al. (1997). *Cell*, 89, 341-347; Laherty CD et al. (1997). *Cell*, 89, 349-356)、E2F/Rb (Brehm A et al. (1998). *Nature*, 391, 597-601; Magnaghi-Jaulin L et al. (1998). *Nature*, 391, 601-605; Luo RX et al. (1998). *Cell*, 92, 463-473)あるいはDNAメチル化 (Nan X et al. (1998). *Nature*, 393, 386-389; Jones PL et al. (1998). *Nature Genet.*, 19, 187-191)の場合にも明らかになっている。しかしながら、Sp1結合配列に結合能をもつ特異的転写因子が、HDAC阻害剤による転写活性化シグナルを介在するか否かは不明であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】
本発明は、効率的な抗腫瘍剤のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】
本発明者らは、抗腫瘍効果を示し、またHDAC阻害剤として知られているTSAが、p21/WAF1/Cip1プロモーターをSp1結合配列を介して活性化することを報告している (Nakano K et al. (1997). *J. Biol. Chem.*, 272, 22199-22206; Sowa et al. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 241, 142-150)。本発明者らは、このTSA刺激に応答したp21/WAF1/Cip1プロモーターの活性化におけるシグナル伝達に関与す

る新たな分子を同定することにより、該分子を標的とした抗腫瘍剤のスクリーニングが可能となると考えた。

【0008】

そこで、本発明者らは、まず、TSAによるp21/WAF1/Cip1プロモーターの活性化において、該プロモータのSp1結合配列に結合している因子をMG63細胞核抽出物のゲルシフトアッセイにより検索し、p21/WAF1/Cip1プロモーターのSp1結合配列にはSp1およびSp3 (Lania L et al. (1997). Int. J. Biochem. Cell Biol., 29, 1313-1323) が主に結合していることを明らかにした。

【0009】

また、本発明者らは、p21/WAF1/Cip1プロモーターとは別に、GAL4結合配列依存性に活性化されるルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いたアッセイ系によりSp1およびSp3の機能の検討を行い、GAL4とSp3の融合タンパク質であるGAL4-Sp3の存在下ではTSAによるレポーター遺伝子の転写誘導が起こるが、GAL4とSp1の融合タンパク質であるGAL4-Sp1にはこの作用がないことを明らかにした。さらに、Sp3の種々の欠失変異体を作成することにより、転写活性化ドメインに2箇所存在するグルタミンリッチ (glutamine-rich) ドメインのうち少なくとも1つを有すれば、TSA刺激に応答した転写活性化が生じうることを示した。さらに、転写活性化ドメインを欠失したドミナントネガティブSp3の強制発現により、TSAによるp21/WAF1/Cip1プロモーターおよびSp1結合配列活性化プロモーターの活性化が抑制されることを明らかにした。

【0010】

これら結果は、TSAによるp21/WAF1/Cip1の転写活性化にSp3が関与していることを証明するものであり、さらに、Sp3を標的として抗腫瘍剤のスクリーニングが可能であることを示唆するものである。本発明者らにより開発された、GAL4結合配列依存性に活性化されるルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いたアッセイ系は、効率的な抗腫瘍剤のスクリーニングに特に好適である。

【0011】

本発明は、腫瘍抑制のメカニズムに関連するSp3タンパク質を標的とした抗腫瘍剤のスクリーニング方法、特にGAL4結合配列依存性に活性化されるルシフェラ

ーゼ遺伝子をレポーターとして用いて効率的に抗腫瘍剤をスクリーニングする方法に関する。

【0012】

より具体的には、本発明は、

- (1) 抗腫瘍剤をスクリーニングする方法であって、
 - (a) (i) Sp3タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質のDNA結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードするDNAを発現可能に含む第一のベクター、並びに (ii) 該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクター、を保持する細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞に対し、被検試料を接触させ、該レポーター活性を測定する工程、
 - (c) 被検試料を該細胞に接触させない場合(対照)と比較して、該レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、
- (2) 異種タンパク質がGAL4タンパク質、LexAタンパク質、またはテトラサイクリンリプレッサータンパク質である、(1)に記載の方法、
- (3) レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスクレバーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ヒト成長ホルモン、または分泌型アルカリホスファターゼをコードする、(1)または(2)に記載の方法、
- (4) Sp3を介する転写活性を促進する化合物を有効成分とする抗腫瘍剤、
- (5) (1)から(3)のいずれかに記載のスクリーニングにより単離しうる、(4)に記載の抗腫瘍剤、に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

実施例に示したように、Sp3の転写活性化ドメインは、p21/WAF1/Cipプロモーターからの転写を上昇させる作用を有する。p21/WAF1/Cipは細胞増殖抑制効果を有しており、制癌作用を有することが知られているTSAにより発現が上昇する遺伝子である。また、p21/WAF1/Cipの発現は、抗腫瘍効果と深い関連がある複数の

HDAC阻害剤により、Sp1結合配列を介して誘導されることが知られている。本発明により、このSp1結合配列を介した転写誘導には、Sp3が関与していることが示されたことから、Sp3の活性を促進させることにより細胞の異常増殖を抑制し、腫瘍に対する治療や予防を行うことが可能となると考えられる。

【0014】

本発明の抗腫瘍剤のスクリーニング方法は、このようにSp3がTSA刺激による抗腫瘍効果の発現のシグナル伝達に関与するという、本発明者らにより見出された知見に基づくものである。さらに、本発明者らにより開発されたレポーター遺伝子を利用したSp3の転写活性の検出系が、TSAのような抗腫瘍効果を示す化合物のスクリーニングに利用しうるという知見にもに基づくものである。

【0015】

本発明のスクリーニング方法の原理は、以下のとくである。まず、Sp3タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質のDNA結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードするDNAを発現可能に含む第一のベクター、並びに該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクターを構築し、これを細胞に導入する。この細胞では、第一のベクターに由来して、Sp3タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質のDNA結合能を有する領域を含む融合タンパク質が発現し、その中の異種タンパク質由来のDNA結合領域を介して第二のベクター上の発現制御領域に結合する。この細胞に、TSAのような抗腫瘍のシグナルに正に作用する化合物が接触した場合、該融合タンパク質の中のSp3タンパク質由来の転写活性化領域を介して第二ベクターの発現制御領域の下流に存在するレポーター遺伝子の転写を活性化するか、あるいは転写抑制を解除することにより、該レポーター遺伝子の発現が誘導される。従って、このレポーター遺伝子を用いたアッセイ系を利用すれば、被検試料を細胞に接触させた後の細胞におけるレポーター活性を検出することにより、効率的にSp3を介した抗腫瘍剤のスクリーニングを行うことができるのである。

【0016】

即ち、本発明のスクリーニング方法は、(a) (i) Sp3タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質のDNA結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードするDNAを発現可能に含む第一のベクター、並びに(iii) 該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクター、を保持する細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対し、被検試料を接触させ、該レポーター活性を測定する工程、(c) 被検試料を該細胞に接触させない場合(対照)と比較して、該レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含むものである。

【0017】

本発明のスクリーニングに用いられる第一のベクターは、Sp3タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質のDNA結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードするDNAを発現可能に含む。「発現可能に含む」とは、融合タンパク質をコードするDNAがベクターにおいてその発現を保証する発現制御領域(例えば、プロモーターやエンハンサー)に結合していることを指す。例えば、融合タンパク質をコードするDNAは、ベクター内でCMVプロモーターなどの適当なプロモーターの下流に挿入されており、該ベクターは、動物細胞や酵母細胞などの適当な宿主細胞内において、該融合タンパク質を発現することができる。

【0018】

第一のベクターにより発現される融合タンパク質に含まれるSp3タンパク質の転写活性化能を有する領域としては、TSA刺激に応答して転写活性化しうる領域を含む限り特に制限はない。好ましくは、転写活性化ドメインの少なくとも一部を含み、DNA結合ドメインの少なくとも一部を欠失している。Sp3由来のDNA結合領域は存在していても、本発明のスクリーニングは可能であるが、該領域が存在するとこれを含む融合タンパク質が内在性の種々のSp1結合配列に結合するため好ましくない。ヒトSp3タンパク質であれば、好ましくは2つのglutamine-rich領域(アミノ酸10~123およびアミノ酸223~358)のいずれか一方または双方を含み、Zinc finger領域(アミノ酸495から517、525から547、および555から575)

) の少なくとも一部を含まない (Chris, K. et al., 1992, J. Biol. Chem., 12: 4251-4261)。Sp3タンパク質が由来する生物種に制限はない。例えば、ヒトや哺乳動物由来のSp3タンパク質、その他の生物種のSp3タンパク質を用いることができる。

【0019】

具体的には、図3に示した、ヒトSp3タンパク質のアミノ酸配列の1から398位の領域、81から398位の領域、161から398位の領域、1から320位の領域、1から240位の領域、1から160位の領域を本発明において好適に利用することができるが、これらに制限されない。

【0020】

また、第一のベクターにより発現される融合タンパク質に含まれる異種タンパク質としては、特定のDNA配列に特異的に結合しうるタンパク質であれば特に制限はない。例えば、GAL4タンパク質、LexAタンパク質 (Gyuris, J. et al., 1993, Cell, 75: 791-803)、テトラサイクリン リプレッサー タンパク質(Tet R) (Manfred, G. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551)などが挙げられるが、これらに制限されない。また、特定のDNA配列に特異的に結合しうる限り、これらタンパク質の部分ペプチドであってもよい。異種タンパク質のDNA結合能を有する領域としては、例えば、GAL4タンパク質のDNA結合ドメイン(例えばアミノ酸1~94、または1~147)、LexAタンパク質のDNA結合ドメイン(例えばアミノ酸1~202) (Erica, A. et al., 1992, Mol. Cell. Biol., 12: 3006-3014)、テトラサイクリン リプレッサー タンパク質(Tet R)のDNA結合ドメイン (Manfred, G. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551)などを含むペプチドが挙げられるが、これらに制限されない。

【0021】

本発明の第二のベクターは、異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む。

【0022】

本発明の第二のベクターの構築に用いられる異種タンパク質の結合配列として

は、第一の発現ベクターから発現誘導された融合タンパク質が特異的に結合しうる配列であれば特に制限はない。例えば、融合タンパク質がGAL4 DNA結合領域を含む場合、結合配列としては、例えば「5'-cgga_sgac_wgtc_tccg-3'； s=cまたはg, w=aまたはt」（Marmorstein, R. et al., 1992, Nature 356:408-414）が挙げられる。また、融合タンパク質がLexA DNA結合領域を含む場合、結合配列としては、例えば「5'-ctgt_nnnnnnnnacag-3'； n=a, t, g, またはc」（Erica, A. et al., 1992, Mol. Cell. Biol., 12: 3006-3014）が挙げられる。また、融合タンパク質がテトラサイクリン リプレッサー タンパク質(Tet R)のDNA結合ドメインを含む場合、結合配列としては、例えば「5'-tccctatcagtgtatagaga-3'」（Manfred, G. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551）が挙げられる。

【0023】

該結合配列は、ベクターが導入される細胞の内因性タンパク質により認識されないものを用いることが好ましい。内因性タンパク質により認識される配列を用いた場合には、内因性タンパク質の作用に応答したレポーター活性が検出されるおそれがあるため好ましくない。

【0024】

該結合配列に第一のベクター由来の融合タンパク質が結合した際の、下流のレポーター遺伝子の発現を保証するために、第二のベクターにおける発現制御配列には、該結合配列以外に、プロモーター配列（例えば、TATA配列、Kozak配列などを含みうる）を含むことができる。

【0025】

第一のベクターからの融合タンパク質がそのDNA結合能を有する領域として、GAL4タンパク質のDNA結合ドメインを用いる場合、第二のベクターに用いられる発現制御配列としては、例えば、5×GAL4結合配列、E1B最小プロモーターおよびTATA配列を含むDNA配列を用いることができる。

【0026】

本発明の第二のベクターにおいては、該発現制御配列の下流にレポーター遺伝子を機能的に結合する。「機能的に結合」とは、レポーター遺伝子が、第一のベ

クター由来の融合タンパク質の発現制御配列への結合に応答して発現するように、該発現制御配列に結合していることを指す。

【0027】

本発明において用いられるレポーター遺伝子としては、その発現産物が検出可能であれば特に制限はないが、ノーザン解析やウェスタン解析などの煩雑な操作を行わずに該発現産物を検出できるものが好ましい。好ましいレポーター遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)遺伝子、ヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)遺伝子などが挙げられる。

【0028】

本発明のスクリーニングに利用する細胞としては特に制限はなく、例えばヒトまたは哺乳動物の細胞、例えばp53が遺伝的に欠失した MG63細胞（ヒト骨肉腫由来の細胞株）を用いることができる。また、酵母細胞や大腸菌などの微生物細胞を用いることもできる。ベクターの作成のための遺伝子操作や細胞へのベクターの導入などは、当業者に公知の方法を利用することができる。

【0029】

本発明のスクリーニングにおいては、上記2つのベクターが導入された細胞に対し、被検試料を接触させ、レポーター活性を測定する。

【0030】

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、天然物抽出液などが挙げられるが、これらに制限はない。細胞への被検試料の接触は、被検試料の種類に応じて、被検試料の細胞培養培地への添加や被検試料の細胞内への導入（遺伝子導入も含む）などの方法で行うことができる。

【0031】

レポーター活性は、レポーター遺伝子の種類に応じて当業者に公知の方法により検出することができる。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝

子を用いた場合には、細胞抽出液にルシフェラーゼの基質を加え、酵素反応により発生する発光量を化学発光検出器により検出することができる。また、レポーター遺伝子としてCAT遺伝子を用いた場合には、細胞抽出液中のCAT量を抗CAT抗体を用いたELISA法により検出することができる。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた場合には、細胞抽出液に β -ガラクトシダーゼの基質を加え、酵素反応により発生する発光量を化学発光検出器により検出することができる。ヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子を用いた場合には、細胞培養液中のhGH量を抗hGH抗体を用いたELISA法により検出することができる。また、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)遺伝子を用いた場合には、細胞培養液にアルカリホスファターゼの基質を加え、酵素反応により発生する発光量を化学発光検出器により検出することができる。

【0032】

レポーター活性の測定の結果、被検試料を接触させない場合(対照)に比べレポーター活性の有意な上昇が認められれば、用いた被検化合物は腫瘍の増殖を抑制する化合物の候補となる。

【0033】

本発明において、抗腫瘍効果に関するTSAからのシグナル伝達において、Sp3を介する転写活性が促進することが示された。この事実は、Sp3を介する転写活性を促進することができる化合物が、抗腫瘍効果を有しうることを示すものである。従って、本発明は、また、Sp3を介する転写活性を促進する化合物を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

【0034】

このようなSp3活性を促進する化合物としては、種々の作用点を有するものが考えられる。例えば、Sp3に直接作用してその機能を促進するもの、Sp3に結合する分子に作用して間接的にSp3の機能を促進するもの、Sp3のDNAへの結合から転写に至るまでの反応に関与するタンパク質群に作用するもの、Sp3とHDACとの相互作用を阻害するもの、HDACの活性を阻害するもの、Sp1の機能を阻害するものが含まれる。このような化合物は、上記の本発明のスクリーニングにより単離することが可能である。

【0035】

本発明のSp3を介する転写活性を促進する化合物は、広範囲の腫瘍に適用可能と考えられる。特に、Sp3を介したp21/WAF1/Cip1の発現誘導はp53非依存的であることから、p53に変異または欠失を持つ腫瘍に対しても適用できることが期待される。

【0036】

本発明のSp3を介する転写活性を促進する化合物を、医薬品として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。

【0037】

患者への投与は、化合物の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われうる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0038】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0039】

【実施例】

[実施例1] p21/WAF1/Cip1プロモーターのSp1結合配列のゲルシフトアッセイTSAはp21/WAF1/Cip1遺伝子のプロモーター領域に存在するSp1結合配列を介して、p53非依存性にp21/WAF1/Cip1遺伝子の転写を誘導する。そこで、この誘導機序を解明する目的で、TSAによる転写誘導に必須である転写開始点より-87～-72 bpをp21/WAF1/Cip1プローブとして以下のようにしてゲルシフトアッセイ(Electr

ophoretic mobility shift assay; EMSA)による結合タンパク質の解析を行った。

【0040】

(1-1) 細胞培養および核抽出液の調製

まずMG63細胞を、10%牛胎仔血清(GIBCO BRL)を含むDMEM培地(GIBCO BRL)を用いて、5% CO₂大気温条件下、37°Cにて培養した。この細胞の核抽出液を、Dignam いて、5% CO₂大気温条件下、37°Cにて培養した。この細胞の核抽出液を、Dignam い、TSA刺激および未刺激細胞より調製した。まず、ディッシュ(100 mm)に培養した細胞を500 ng/mlのTSA(和光純薬)で24時間インキュベートした後、0.5 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoreide・HCl(p-ABSF)(和光純薬)を含む冷PBSで2回洗浄し、ディッシュより搔き取って、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、5 mM NaF、5 mM NaVO₄、0.5 mM p-ABSFを含む10 mM Hepes/KOH緩衝液(pH7.9)に懸濁した。氷上で10分間静置した後、ダウンス型ホモジナイザーを用いて細胞を破碎した。3,000 rpm、10分間、4°Cで遠心の後、核を400 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、25% glycerol、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、5 mM NaF、5 mM NaVO₄、0.5 mM p-ABSFを含む20 mM Hepes/KOH緩衝液(pH7.9)に再懸濁し、4°Cにて60分間攪拌して核成分を溶出した。その溶出液を35,000 rpm、30分間、4°Cで遠心し、その上清を核抽出液として回収した。得られた核抽出液は、400 mM KCl、20% glycerol、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、5 mM NaF、5 mM NaVO₄、0.5 mM p-ABSFを含む20 mM Hepes/KOH緩衝液(pH7.9)に対して透析を行い、-80°Cに保存した。

【0041】

(1-2) ゲルシフトアッセイ(EMSA)

次に、p21/WAF1/Cip1遺伝子の転写開始点より-87~-72 bpに存在するTSA依存性のプロモーター配列(5'-CGGGTCCCGCCTCCTT-3' /配列番号: 1)をもとにオリゴヌクレオチド(5'-AGCTCGGGTCCCGCCTCCTT-3' /配列番号: 2、および 5'-TCGAAAGGAGGCCGGACCCG-3' /配列番号: 3)を合成し、アニール後、[α -³³P] dCTP、Klenow Fragment (TAKARA) を用いてDNAをラベルし、これをDNAプローブとした。上記の核抽出液(8 μ g)を20 μ lの反応液(8 mM Tris/HCl (pH7.9)、24 mM Hepes/KCl (pH7.9)、120 mM KCl、24% glycerol、2 mM EDTA、2 mM DTT、1 mg poly(dI-dC))

(Pharmacia) 中で5分間インキュベートした後、³³PラベルしたDNA プローブ(比活性 50,000 cpm/ μ l)を加えてさらに20分間結合反応を行った。なお、後述の抗体によるスーパーシフトの実験では、さらに2 μ gの抗Sp1あるいは1 μ g抗Sp3 抗体(Santa Cruz, sc-59X and sc-644X)を加えて20分間インキュベートした。反応液を6%アクリルアミドゲルにて泳動し、BAS 2000 (Fujix) を用いて p21/WAF1/Cip1 プローブに結合するタンパク質を検出した。

【0042】

(1-3) 結果

TSA刺激および未刺激のMG63細胞より調製した核抽出液をp21/WAF1/Cip1プローブと反応させ、上記のゲルシフトアッセイを行ったところ、2本の特異的なバンドが検出された(図1、1および5)。ついで、抗Sp1あるいは抗Sp3抗体を用いて、上述の方法によりスーパーシフトによる各バンドの反応性を見たところ、抗Sp1抗体により上側のバンドの一部、抗Sp3抗体で上側のバンドの一部と下側の2本のバンドがシフトし、抗Sp1抗体と抗Sp3抗体を両方加えることで、すべてのバンドのシフトが観察された(図1)。Sp3の2本のバンドはそれぞれ高分子(97 kDa)と低分子(60 kDaと65 kDa)のSp3タンパク質に由来すると考えられる(Gustav H. et al. 1994, EMBO J., 13, 3843-3851; Addanki P. B. et al. 1997, Nucleic Acids Res., 25, 2012-2019)。したがって、MG63細胞の核抽出液に存在するSp1およびSp3が実際にp21/WAF1/Cip1のSp1結合部位と結合することが示され、Sp1およびSp3がTSA依存性の転写誘導に関与することが示唆された。これらの結果は以前の本発明者らの報告(Nakano K et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 22199-22206)および他のグループの報告(Datto MB et al. (1995). J. Biol. Chem., 270, 28623-28628; Adnane J et al. (1998) Mol. Cell. Biol., 18, 6962-6970)と一致した。しかしながら、TSAによる刺激の有無によりSp1およびSp3のDNA結合量には差が認められなかった(図1)。このことから、TSA依存性の転写誘導はSp1あるいはSp3の発現量あるいはDNA結合能の変化以外の機序によるものと推察された。これは同じくHDAC阻害剤であるsodium butyrateを用いた本発明者らの報告(Nakano K et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 22199-22206)およびTGF- β 依存性の転写誘導をみたDattoらの報告(Datto MB et al. (1995). J. Biol. Chem.

, 270, 28623-28628)と一致したが、geranylgeranyl-transferase I 阻害剤を用いたAdnaneらの報告(Adnane J et al. (1998) Mol. Cell. Biol., 18, 6962-6970)とは異なる。

【0043】

[実施例2] GAL4結合配列を用いたレポーターアッセイ

TSAは、p21/WAF1/Cip1プロモーターのSp1結合配列を介して転写誘導を起こすのと同様に、SV40プロモーターに挿入したコンセンサスな3xSp1 結合配列を介しても転写誘導を起こすことができる(Sowa Y et al. (1997). Biochem. Biophys. Res. Comm., 241, 142-150)。そこで、このSp1結合配列に結合が認められたSp1あるいはSp3が実際にTSA刺激による転写誘導に関与するかどうかを、GAL4結合配列を用いたレポーターアッセイ系で検討した。すなわち、Sp1やSp3の作用を強制発現で見ようとする際に、Sp1結合配列をレポーター遺伝子のプロモーターとして用いても内因性のSp1あるいはSp3の作用を検出しまうため、バクテリアのGAL4タンパク質のDNA結合ドメインとSp1あるいはSp3との融合タンパク質を強制発現させ、GAL4結合配列依存性の転写活性がTSAで誘導されるかどうか、また、その誘導がSp1とSp3のいずれで制御されるのかを解析した。

【0044】

(2-1) 発現プラスミドおよびレポータープラスミド

GAL4タンパク質のDNA結合ドメインのC末端側にSp1 (アミノ酸83~778)、全長Sp3 (アミノ酸1~653)、転写活性化ドメイン欠失Sp1 (アミノ酸592~778) (DNSp1) および転写活性化ドメイン欠失Sp3 (アミノ酸399~653) (DNSp3) をそれぞれ融合したタンパク質を発現させる目的で、GAL4結合ドメインを含むpMベクター(Clonitech)に各遺伝子を挿入し、pM-Sp1、pM-Sp3、pM-DNSp1およびpM-DNSp3を作成した。各Sp1およびSp3遺伝子はPCR法により増幅した。具体的には、pM-Sp1の作製には、Sp1-Sプライマー (5'-acaggtgagcttga-3' /配列番号：4) およびSp1-ASプライマー (5'-tcagaaggccattgcc-3' /配列番号：5) を用いて、pPacSp1を鑄型にして増幅を行った(Kadonaga, J.T. et al., 1987, Cell, 51: 1079-1090)。pM-DNSp1の作製には、DNSp1-Sプライマー (5'-ccaaaaaagaagagaaaggtaacccggcgg-3' /配列番号：6) およびDNSp1-ASプライマー (5'-gaagcatgcacctgc-3' /配列番

号：7）を用いて、pM-Sp1を鋳型にして増幅を行った（Kadonaga, J.T. et al., 1987, Cell, 51: 1079-1090）。pM-Sp3の作製には、Sp3-18Fプライマー（5'-cg ggatccattccaaggtgctgct-3' /配列番号：8）およびSp3-2Rプライマー（5'-atagga tccttactccattgtctcatttcc-3' /配列番号：9）を用いて、Marathon-Ready cDNA (Human Fetal Liver) (Clontech, Cat. #7403-1) を鋳型にして増幅を行った（Chris, K. et al., 1992, J. Biol. Chem., 12: 4251-4261）。pM-DNSp3の作製には、Sp3-11Fプライマー（5'-cggatccaaactctatagattctgct-3' /配列番号：10）およびSp3-2Rプライマー（配列番号：9）を用いて、pM-Sp3を鋳型にして増幅を行った（Chris, K. et al., 1992, J. Biol. Chem., 12: 4251-4261）。PCRの反応は、全て「94℃ 1分、55℃30秒、72℃30秒」を30サイクルの条件で行った。PCRの増幅産物は pMベクターに挿入し、DNAシーケンサーABI PRISM 355 (Applied Bio System)により塩基配列の確認を行った。トランスフェクション試験の対照としてはGAL4 DNA結合ドメインのみを発現するpMを用いた。GAL4依存性の転写活性の指標となるレポータープラスミド（pG5-luc）としては、5xGAL4結合配列、E1B最少プロモーターおよびTATA配列をルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したpGL3-Basic Vector (Promega)を用いた。

【0045】

(2-2) トランスフェクションアッセイ

Sp1あるいはSp3の各種GAL4融合タンパク質をコードする上記発現ベクターは、コンセンサスな5xGAL4結合配列の下流にルシフェラーゼレポーター遺伝子を持つ上記ベクターとともに、SuperFectを用いたQIAGEN社の方法に従ってMG63細胞にトランスフェクトした。すなわち、12穴プレートに 0.8×10^5 個/wellの細胞を巻き、24時間後に、あらかじめ $0.5 \mu\text{g}$ のレポータープラスミド、 $2.5 \mu\text{g}$ の発現ベクターおよびSuperFectを混合した反応液をMG63細胞に添加して2時間反応させた。引き続き通常の培養条件下で24時間培養し、 500 ng/ml のTSA存在下あるいは非存在下(対照)でさらに24時間培養した後、細胞を溶解しルシフェラーゼ基質(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性をLB-96P (Berthold)で測定した。測定値は同一タンパク量当たりの活性に換算して表し、TSAによる転写誘導はTSA非存在下の対照値との比 (TSAによる活性化倍率) として計算した。

[0 0 4 6]

(2-3) 結果

[0047]

[実施例 3] Sp3のTSA応答領域の同定

次に、Sp3のTSA応答領域を同定する目的で、GAL4のDNA結合ドメインと融合した種々のSp3欠失変異体を用いたレポーターассеイを行った。まず、pM-Sp3 (1-398)、pM-Sp3 (81-398)、pM-Sp3 (161-398)、pM-Sp3 (241-398)、pM-Sp3 (1-80)、pM-Sp3 (1-160)、pM-Sp3 (1-240) および pM-Sp3 (1-320) を作成した。それぞれ、記載のアミノ酸番号に相当する領域を持つ。各 Sp1 および Sp3 遺伝子は PCR 法により増幅した後、pMベクターに挿入し、DNA シーケンサー ABI PRISM 355 (Applied Bio System) により塩基配列の確認を行った。なお、PCR 法による増幅に用いたプライマー配列を表 1 に示す。PCR は 鑄型に pM-Sp3 を用い、「98°C 15 秒、65°C 2 秒、74°C 30 秒」を 25 サイクルの条件で行った。

[0048]

【表1】

プラスミド プライマー

pM-Sp3(1-398)

Sp3-18F

(5'-cgggatccattccaagtgcgtgct-3' /配列番号 : 8)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI

(5'-gcggatcccactgttaactgttttag-3' /配列番号 : 11)

pM-Sp3 (81-398)

Sp3(241-260) S + BamHI

(5'-cgggatccggctctaataatcaaacccttact-3' /配列番号 : 12)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI (配列番号 : 11)

pM-Sp3 (161-398)

Sp3(481-500) S + BamHI

(5'-cgggatccggcattaatgccgacggaca-3' /配列番号 : 13)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI (配列番号 : 11)

pM-Sp3 (241-398)

Sp3(721-740) S + BamHI;

(5'-cgggatcccaggaaattatatccagtc-3' /配列番号 : 14)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI (配列番号 : 11)

pM-Sp3 (1-80)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(240-221)AS + BamHI

(5'-cgggatccaggaatgatctgaatttgac-3' /配列番号 : 15)

pM-Sp3 (1-160)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(480-461)AS + BamHI

(5'-cgggatccgtcagtcattgtctgagaac-3' /配列番号 : 16)

pM-Sp3 (1-240)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(720-701)AS + BamHI

(5'-cgggatccaagatctgaagaatgaacct-3' /配列番号 : 17)

pM-Sp3 (1-320)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(960-941)AS + BamHI

(5'-cgggatccaaaggttccaggattcagct-3' / 配列番号 : 18)

【0049】

トランスフェクション試験の対照としてはGAL4 DNA結合ドメインのみを発現するpMを用いた。GAL4依存性の転写活性の指標となるレポータープラスミド(pG5-luc)としては、上記のpGL3-Basic Vector (Promega)を用いた。

【0050】

これらの遺伝子を用いて、上記と同様の方法によりトランスフェクションを行い、TSA刺激による転写誘導がこれらの変異体によって起こるかどうかを測定した。その結果、Sp3のDNA結合ドメインを欠失したGAL4-Sp3 (1-398)のみでもTSA依存性の転写誘導が起こり、その誘導はGAL4-Sp3よりむしろ強いものであった(図3)。これは先に述べたN末端側の転写活性化ドメインの欠失でTSA刺激による転写誘導が消失する結果(実施例2)と相關した。また、Sp3に存在する2つのglutamine-richドメインのうちのC末端側のドメインとDNA結合ドメインの間に存在する抑制性ドメインがSp3の転写活性を抑制するという報告とも相關を示唆した(Dennig J et al. (1996). EMBO J., 15, 5659-5667; Majello B et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 4021-4026)。

【0051】

また、図3に示すように、Sp3 (1-398)のN末端側もしくはC末端側から欠失を加えた場合、GAL4-Sp3 (241-398)およびGAL4-Sp3 (1-80)においてTSA刺激による誘導が消失した。これらの結果から、Sp3 (81-160)がTSA刺激による転写誘導に重要と考えられたが、GAL4-Sp3(81-160)のみでは活性はほとんど認められなかつた。GAL4-Sp3 (241-398)およびGAL4-Sp3 (1-80)とも完全なglutamine-richドメインを欠くことから、TSAによる転写誘導にはSp3の転写活性化ドメインの2つのglutamine-richドメインのうち少なくともいずれか一方が存在することが必須であることが示された。また、Sp3の80-160の部分にはTSA刺激による転写誘導に重

要な領域の一部が含まれていることが考えられる。

【0052】

[実施例4] ドミナントネガティブSp3

さらに、Sp3がp21/WAF1/Cip1のSp1結合配列を介するTSAの転写誘導に実際に関与するかいなかを検討する目的で、転写活性化ドメインを欠失し、DNA結合ドメインのみをもつSp3変異体(DNSp3)（アミノ酸399～653）をpCMV3.1-His-C (Invitrogen)に組み込んだpCMV-DNSp3を作成した。対照としてはpCMV3.1を用いた。レポータープラスミドには以前に報告したp21/WAF1/Cip1プロモーター、TSAに依存性のp21/WAF1/Cip1最少プロモーターをそれぞれルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したpWWPおよびpWPdel-BstXI、また、3xSp1結合配列、変異型3xSp1結合配列をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したSp1-lucおよびmtSp1-lucを用いた(Nakano K et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 22199-22206、Sowa Y et al. (1997). Biochem. Biophys. Res. Comm., 241, 142-150)。

【0053】

これらの遺伝子を上記と同様にトランスフェクションにより強制発現させて、これがTSAの転写誘導に対してドミナントネガティブに働くかどうかを検討した。その結果、DNSp3によりTSAによるp21/WAF1/Cip1の転写誘導は著明に抑制され、これはSp1結合配列を含むTSA依存性のp21/WAF1/Cip1プロモーターの最少単位(転写開始点より+16～-101)をもつpWPdel-BstXIでも確認された(図4a, b)。また同様に、コンセンサスなSp1結合配列からのTSAによる転写誘導も著明に抑制された(図4c)。変異Sp1結合配列を用いたときにはTSAによる転写誘導は起こらないが、DNSp3による影響もみられなかった(図4d)。いずれのプロモーターを用いた場合にも、TSA未刺激の基本転写活性に対してはDNSp3は抑制作用を示さなかった。以上のことから、Sp3の転写活性化ドメインがTSA依存性のp21/WAF1/Cip1の転写誘導に重要であることが明らかになった。Sp3はTSA未刺激時には転写因子として極めて弱い活性しかもたないが、TSA刺激時には恐らくHDACを抑制することでアセチル化された何らかの分子を認識することにより強力な転写活性を発現するものと予想される。

【0054】

近年、癌に対する新しいアプローチとして転写調節化学治療あるいは転写調節化学予防が提唱されている(Sakai T. (1996). Jpn. J. Hyg., 50, 1036-1046)。細胞増殖抑制性のp53の標的遺伝子に対して、それらの転写を誘導するなど、p53が多くのことにより制癌作用を発揮させようとするものである。しかし、ヒト癌細胞において変異が認められる(Sakai T. (1996). Jpn. J. Hyg., 50, 1036-1046; Vogelstein B and Kinzler KW. (1992). Cell, 70, 523-526)点で、転写誘導の標的として欠点を有するのに対し、p53の標的遺伝子の1つであり細胞周期抑制作用を持つp21/WAF1/Cip1はヒト癌細胞において変異がほとんど報告されていないことから(Chedid M et al. (1994). Oncogene, 9, 3021-3024; Li YJ et al. (1995). Oncogene, 10, 599-601)、その転写誘導によって制癌作用を期待することができる。本発明においてヒストンアセチル化を介してp53非依存性にp21/WAF1/Cip1の転写誘導を起こす経路が存在することが見い出されたが、これはp53が変異している癌に対しても転写調節化学治療あるいは転写調節化学予防が可能であることを示唆している。HDAC阻害剤は1つの可能性として考えられるが、実際に、all-trans-レチノイン酸抵抗性の急性白血病(acute promyelocytic leukemia)では、HDAC阻害剤でありサラセミア(thalassemia)やアンモニア過剩血症(hyperammonemic states)の治療に用いられていたフェニル酪酸ナトリウム(sodium phenylbutyrate)がall-trans-レチノイン酸と併用することにより完全治癒させることができている(Warrel RP Jr et al. (1998). J. Natl. Cancer Inst., 90, 1621-1625)。これらの結果は癌治療における1つの標的分子としてHDACの可能性を示唆するものである。

[0055]

【発明の効果】

【発明の概要】
本発明により、HDACを制御するSp3が癌治療における新たな標的分子となり得ることが示された。また、本発明により、Sp3を標的とした効率的な抗腫瘍剤のスクリーニング方法が提供された。本発明のスクリーニングにより単離される化合物は、癌に対する新しい転写調節化学治療や予防への応用が期待される。

[0056]

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> Methods for screening anti-tumor agents

<130> C2-101

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized oligonucleotide sequence

<400> 1

cgggtcccgcc tcgcctt

16

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence

<400> 2

20

agctcgggtc ccgcctccctt

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence

<400> 3

20

tgcggaaaggag gcgggaccccg

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

特平11-077350

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

acaggtgagc ttga

14

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

tcagaaggcca ttgcc

15

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ccaaaaaaga agagaaaggt aaccggcg

30

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

gaagcatgca cctgc

15

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

cgggatccat tccaaagtgc t gct

23

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

ataggatcct tactccattg tctcatttcc 30

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

cgggatccaa ctctatagat tctgct 26

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

26

cgggatccca ctgtaactgt ttgttag

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

28

cgggatccgg ctctaatcaa accttact

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

28

cgggatccgg cattaaatgcc gacggaca

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

cgggatccca gggaaattat atccagtc

28

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

cgggatccag gaatgatctg aatttgac

28

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially

synthesized primer sequence

<400> 16

28

cgggatccctg cagtcattgt ctgagaac

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

28

cgggatccaa gatctgaaga atgaacct

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

28

cgggatccaa aggttccagg attcagct

【図面の簡単な説明】

【図1】

TSA依存性のp21/WAF1/Cip1プロモーター活性化に必要なSp1結合配列へのSp1およびSp3の結合。TSA刺激(レーン 5-9)および未刺激(レーン 1-4)のMG63細胞核抽出液にてEMSAを行った。TSA依存性のプロモーター活性化に必要なSp1結合配列(転写開始点より-87~-72)をDNAプローブとした。各バンドに対するスーパーシフトアッセイを抗Sp1抗体(レーン 2, 4, 6 または 8)あるいは抗Sp3抗体(レーン 3, 4, 7 または 8)を用いて行った。Sp1およびSp3のバンドの位置を図左に示した。

【図2】

Sp3によるTSA依存性の転写誘導。 $2.5\mu g$ のGAL4-Sp1あるいはGAL4-Sp3プラスミドと $0.5\mu g$ のpG5-lucレポータープラスミドをMG63細胞に同時にトランスフェクションした。24時間後にTSA (500 ng/ml)を加え、さらに24時間後に細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定した。TSAによる転写誘導はTSA未刺激の対照値との比で示した。実験は3連で行い、示したデータは5回の実験の代表的な結果である。

【図3】

Sp3のglutamine-richドメインを介するTSA依存性の転写誘導。各種GAL4-Sp3の欠失変異タンパク質の配列を図に示した。また、各タンパク質をMG63細胞に発現させた時のTSAによる転写誘導の割合を図右にそれぞれ示した。トランスフェクションおよびTSA刺激は図2と同様に行った。実験は3連で行い、示したデータは3回の実験の代表的な結果である。

【図4】

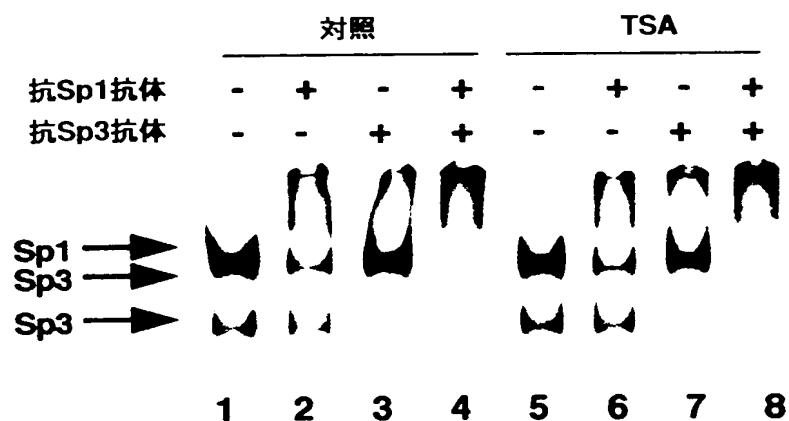
ドミナントネガティブSp3によるTSA依存性のp21/WAF1/Cip1プロモーターあるいはSp1プロモーター転写誘導の抑制。0、1.25、2.5または $5.0\mu g$ のpCMV-DNSp3を、対照のpCMV3.1を加えてプラスミド量を合計 $5.0\mu g$ に調整し、 $0.5\mu g$ のレポータープラスミドと同時にMG63細胞にトランスフェクションした。レポータープラスミドにはpWWP (a)、pWPdel-BstXI (b)、Sp1-luc (c)あるいはmtSp1-luc (d)を用いた。トランスフェクションおよびTSA刺激は図2と同様に行った。実験は

特平11-077350

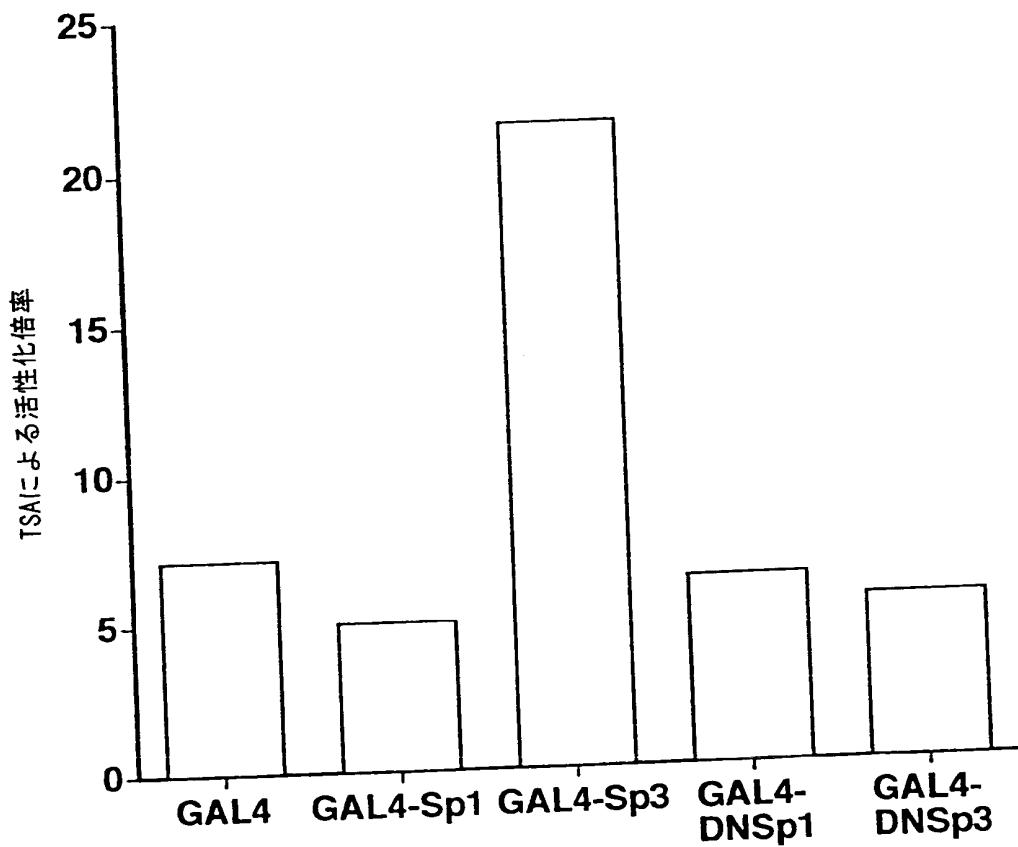
3連で行い、示したデータは3回の実験の代表的な結果である。

【書類名】 図面

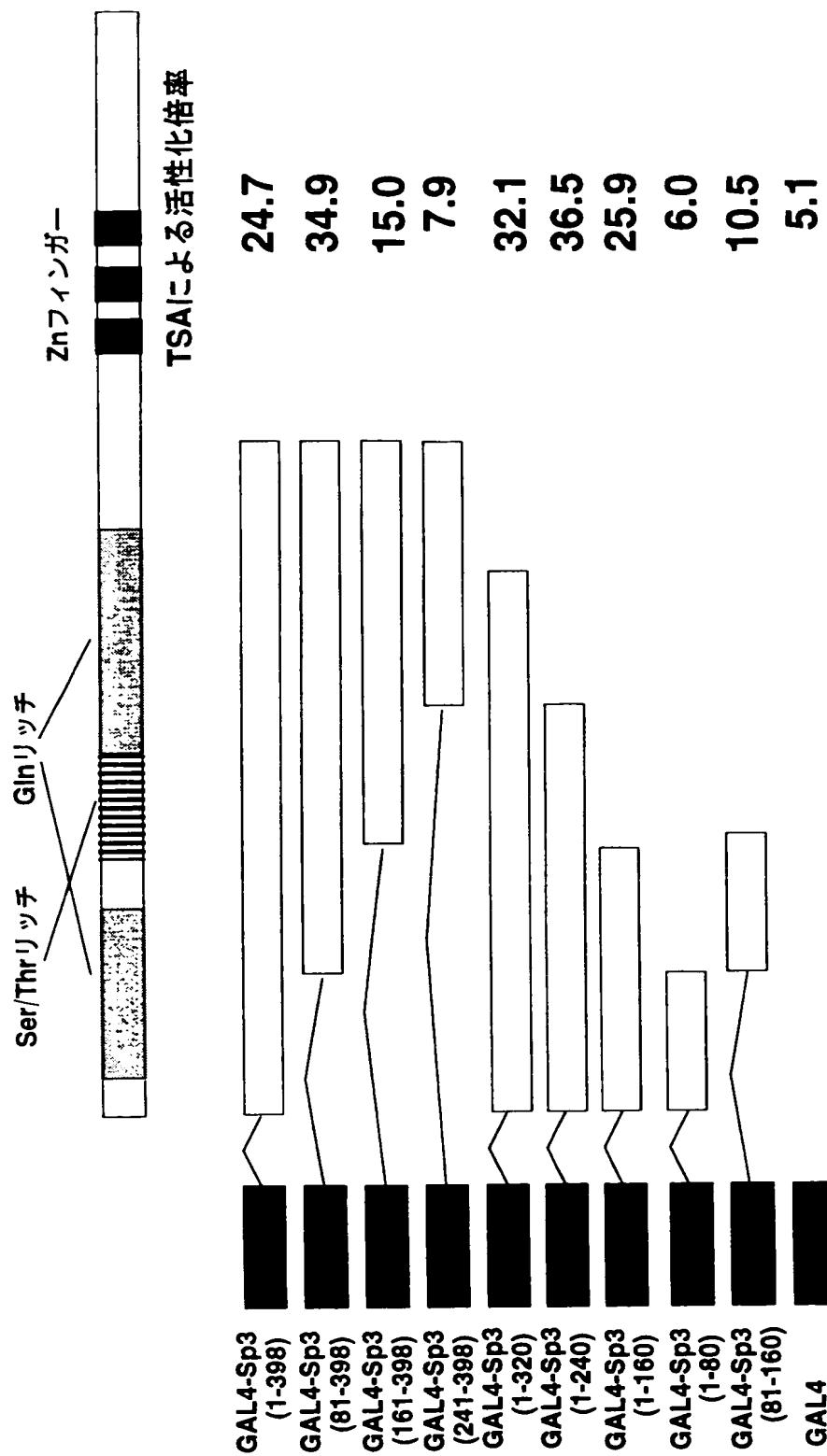
【図1】



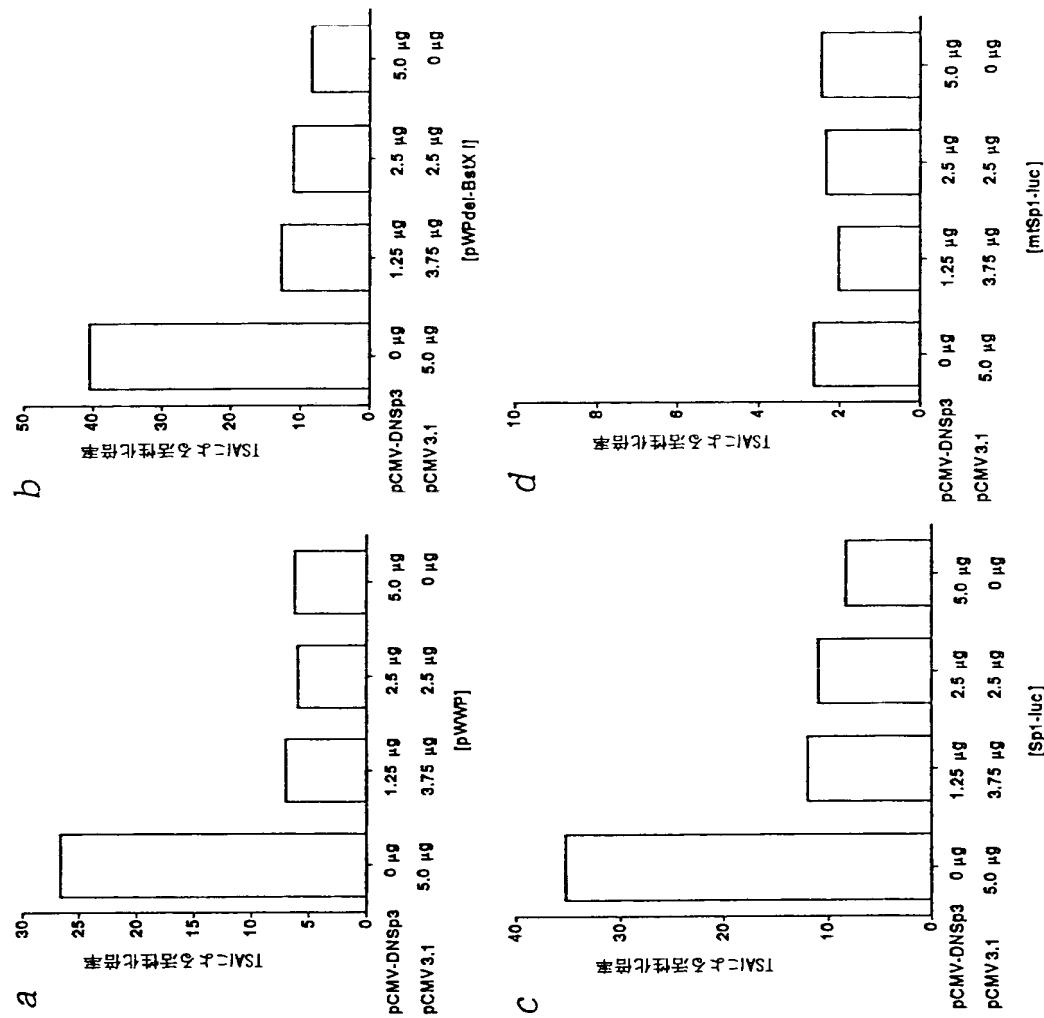
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な抗癌剤のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 増殖抑制効果(制癌作用)を有するサイクリン-CDK阻害因子の発現が、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(トリコスタチンA)により誘導される機構を解析することにより、該因子の発現誘導には、プロモーターに存在するSp1結合配列にSp3が結合することが重要であることが判明した。従って、Sp3の活性を上昇させる薬剤をスクリーニングすることにより、新たな抗腫瘍剤を開発することが可能となる。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2
氏 名 株式会社中外分子医学研究所

